

200934002A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明
に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明
に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 平成21年度総括研究報告	1
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 研究代表者 天谷 雅行	
II. 平成21年度分担研究報告	
フィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患マウスモデルの作製	9
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 天谷 雅行	
皮膚タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の協調による外来抗原捕捉機構に関する研究	14
慶應義塾大学医学部 総合医科学研究センター 特別研究講師 久保 亮治	
アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析	19
京都大学大学院医学研究科 皮膚科学 准教授 椛島 健治	
上皮バリア機能障害における表皮タイトジャンクションの異常の検討	23
神戸大学大学院医学研究科 細胞生物学分野 教授 古瀬 幹夫	
経皮的抗原感作と喘息	27
慶應義塾大学医学部 呼吸器内科学 准教授 浅野 浩一郎	
皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析	30
慶應義塾大学医学部 生命情報学センター 教授 工藤 純	
簡易同定法によるアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析	33
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師 海老原 全	
皮膚の乾燥を防ぐ適切な生活習慣と保湿スキンケアの教育によるアトピーマーチの予防に関する小・中学生を対象とした検討	35
京都府立医科大学大学院医学研究科 皮膚科学 教授 加藤 則人	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 平成21年度班会議プログラム	43
V. 平成21年度構成員名簿	59

I. 平成 21 年度総括研究報告

バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明に関する研究

研究代表者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 本研究では、皮膚バリア機能障害による慢性抗原刺激が、アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的原因であるという新しい仮説のもとに、新規モデルマウスを用いた免疫学的基礎的検討と、患者遺伝子解析および特定地域の疫学的調査による臨床的検討を総合的に行い、未解決であるアトピー性疾患の発症機序を解明する。さらに、出生時からのバリア機能を保持することによる疾患予防の確立を目指す。

マウスを用いたアプローチでは、昨年度作出されたフィラグリンノックアウトマウスを用いて、角層バリア機能の評価を行い、天然保湿因子（NMF）の著しい低下を認めるものの、経皮的水分蒸散量（TEWL）の低下を認めなかった。同マウスは、フィラグリンによる角層バリア機能を解析する上で重要なツールとなることが示された。Flaky tailマウスにダニ抗原を経皮感作することにより、皮膚炎、高IgEを呈するアトピー性皮膚炎類似のマウスモデルを確立した。さらに、経皮的抗原感作により、マウスにおいて遷延性の好酸球気道炎症を誘導することを示した。また、哺乳類表皮タイトジャンクションバリアを世界で初めて*en face*に可視化することに成功し、活性化したランゲルハンス細胞の樹状突起が表皮タイトジャンクションを突き抜けて角質層の直下にまで伸長し、外来抗原を捕捉することを発見した。ヒトにおけるアプローチでは、日本人特有の遺伝子変異を効率よく検出できる簡便法を構築し、アトピー性皮膚炎患者194名において、ヨーロッパ型変異は認められず、アジア型変異が計18名（9.2%）で検出された。京都府山間部の小・中学校の生徒を対象とした疫学調査において、スキンケアに関する教育介入により、アトピー性皮膚炎の有病率が減少し得ることを示した（有病率：平成20年11.6%、21年8.5%）。本年度は、3年計画の最終年度として、アトピー性疾患発症機序としての皮膚バリア機能障害の重要性をマウス、ヒトの両面から確立することができた。

研究分担者

- 古瀬幹夫 神戸大学大学院医学研究科
細胞生物分野 教授
- 工藤 純 慶應義塾大学医学部生命情報学
センター 教授
- 加藤則人 京都府立医科大学大学院医学研究
科皮膚科学 教授
- 梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚
科学准教授
- 浅野浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学
准教授
- 海老原全 慶應義塾大学医学部皮膚科学
専任講師
- 久保亮治 慶應義塾大学医学部総合医科学研
究センター 特別研究講師

A. 研究目的

本研究では、皮膚バリア機能障害による慢性抗原刺激が、アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的原因であるという新しい仮説のもとに、新規モデルマウスを用いた免疫学的基礎的検討と、患者遺伝子解析および特定地域の疫学的調査による臨床的検討を総合的に行い、未解決であるアトピー性疾患の発症機序を解明する。さらに、出生時からのバリア機能を保持することによる疾患予防の確立を目指す。

具体的には、角層の主要構成蛋白であるフィラグリンを欠損させたフィラグリンノックアウトマウスを作成し、本来のアトピー性皮膚炎の発症プロセスを近似したモデルを作成する。アトピーマーチとして知られるアトピー性皮膚炎から気管支喘息への移行のメカニズムを、モデルマウスを用いて解析する。皮膚におけるタイトジャンクションのバリア機能を明らかにする。日本人患者DNAを用いて、フィラグリンなどのバリア機能関連遺伝子の解析を、新たに開発したショットガンPCR法にて、効率よく解析する。啓蒙活動によるスキンケアによる皮膚バリア機能保持とアトピー性疾患罹患率との関係を疫学的に検討する。

B. 研究方法

1) フィラグリンノックアウト (KO) マウスの解析

フィラグリンKOマウスの角層を用いてアミノ酸分析を施行した。天然保湿因子をin vivo共焦点ラマン分光装置を用いて測定した。

2) フィラグリンKOマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

フィラグリン欠損マウスの耳翼に、人為的皮膚バリア破壊の操作を加えることなく、ダニ抗原を隔日で繰り返し塗布し、肉眼的皮膚炎の形成を観察した。

3) flaky tail マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

flaky tail マウスに用いて、バリア破壊を行わずにダニ抗原を耳介や背部に塗布し、臨床症状、耳介腫脹反応、組織学的所見を検証した。

4) 皮膚タイトジャンクションの三次元可視化

マウス耳表皮シートを用いて、表皮TJバリアを立体的に可視化する方法を初めて確立した。本方法を用いて表皮TJバリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化し、その相互作用を検討した。また蛋白ビオチン化試薬およびビオチンラベルした抗原を表皮に塗布し、抗原の取り込み過程を精査した。

5) 上皮バリア機能障害における表皮タイトジャンクションの異常の検討

クローデインを発現しているがTJを形成していないケラチノサイトの培養細胞系として、ヒト表皮癌細胞A431細胞を実験に用いた。細胞外より無血清培地に加えたトリプシン等のプロテアーゼを作用させたのち、細胞を固定して、TJ形成を抗クローデイン1抗体による蛍光抗体法および凍結切断レプリカ法で観察した。TJ形成における細胞接着の役割、シグナル伝達系の関与について種々の阻害剤を用いて解析した。

6) 経皮的抗原感作による喘息誘導

C57BL/6マウスの背部に卵白アルブミン(OVA)をしみこませたパッチを貼付(週1回、3回)した後、OVA吸入暴露を行った。全身感作群にはハプテンであるアラムとOVAとともに腹腔内に投与した。曝露は卵白アルブミンエアロゾル(2%)吸入によって行った。曝露翌日、4日目、7日目、14日目に気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、BAL液中の炎症細胞数およびその分画、インターロイキン13(IL-13)濃

度を評価した。メサコリン気道過敏性はFlexiVent法で測定した。

7) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

新たに開発されたFLG-shotgun法により同定された2種類の新規ナンセンス変異8666-8667 CC>GA (S2899X), 9887 C>A (S3296X)を含む、4種類のアジア型遺伝子変異(S2899X, S3296X, S2554X, 3321delG)と、3種類のヨーロッパ型変異(R501X, 2282del4, 3702delG)に関して遺伝子解析を行った。アトピー性皮膚炎患者DNAを用いて、これらの遺伝子バリエーション、遺伝子変異について、それぞれPCR、制限酵素処理、sequencingを組み合わせることによって確立した簡易同定法による解析を行った。

8) 疫学的解析

京都府山間部の一小・中学校の全児童・生徒を対象として、アトピー性皮膚炎や乾燥皮膚の有無に関する皮膚の検診を行うとともに、喘息やアレルギー性鼻炎の有無について質問票による調査を行う。また全児童・生徒から血液を採取し、血清総IgE値やダニ・スギ特異IgE値を測定し、乾燥皮膚と血清IgE値の関係について解析する。さらに、適切な入浴法・暖房法および保湿スキンケアの方法とその意義に関する教育介入を、本小・中学生とその保護者、さらには本自治体で行われる乳幼児検診に参加した保護者すべてに継続して行う。

C. 結果

1) フィラグリンノックアウト (KO) マウスの解析

フィラグリンは角層内アミノ酸の主要構成成分と考えられている。フィラグリン欠損マウスでは、角層内アミノ酸量が減少しているかどうかを観察するために、アミノ酸分析を行ったところ、フィラグリン欠損マウスでは、角層内のアミノ酸量が著しく低下していた。

NMFは、フィラグリンが分解して生じるアミノ酸が主な成分である。フィラグリン欠損マウスでNMFが減少しているかどうかを検証するためにin vivo ラマン分光装置を用い、角層内のNMF量を測定したところ、

フィラグリン欠損マウスでは野生型マウスに比べ、著しいNMFの減少を認めた。

2) フィラグリンKOマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

マウス耳翼にダニ抗原を隔日で繰り返し8回塗布したところ、野生型マウスでは耳翼に明らかな変化が見られなかったのに対し、フィラグリン欠損マウスでは肉眼的皮膚炎形成を認めた。

3) flaky tail マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

flaky tail (*ft/ft*) マウスにダニ抗原を耳介周囲に反復塗布していくと耳介腫脹、scratching回数の増加、耳介・顔面のびらんなどを認め、さらに病理組織において炎症細胞の強い浸潤を認めた。さらに、flaky tailマウスでは血清IgE値の上昇、経皮水分蒸散量(TEWL)の上昇を認め、バリア機能の低下をみとめた。これらの所見はC57BL/6マウスにおける同様の処置では認められなかった。

4) 皮膚タイトジャンクション (TJ) の三次元可視化

哺乳類表皮TJバリアを世界で初めて*en face*に可視化することに成功した。TJバリアは顆粒層の外から2層目の細胞間をシールしていた。次に、TJバリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化した。休止期のランゲルハンス細胞は、基底層と有棘層の間に細胞体があり、樹状突起を表皮上層に向かって伸ばしているが、樹状突起の先端はTJバリアより内側にとどまっていた。活性化したランゲルハンス細胞の樹状突起が表皮TJとドッキング、または表皮TJを突き抜けて角質層の直下にまで伸長することを発見した。さらに、表皮TJバリアの外側に出た部分より、外来抗原が取り込まれ、樹状突起内を運ばれて核周辺に集積することを示した。さらに、TJとドッキングした樹状突起とケラチノサイトの間に機能的なTJが形成され、角質層を通り抜けた外来抗原の無制限な侵入を防いでいることを示した。

5) 上皮バリア機能障害における表皮タイトジャンクションの異常の検討

A431細胞は正常皮膚と同様、クローデ

イン1, クローディン4を発現しているが、通常これらは細胞膜上に広く分布してTJを形成していない。ところがA431細胞にトリプシンを作用させると、クローディンのパッチ状の濃縮が誘導され、TJ形成が誘導された。クローディンはトリプシンによる消化を受けない。トリプシンによるTJ形成に関わるシグナル伝達を明らかにするために、以下の酵素阻害剤を作用させたが、TJ形成は阻害されなかった(チロシンキナーゼ、PKA、PKC、PI3キナーゼ、c-Src、MAPKキナーゼなど)。キモトリプシン処理によってもTJ形成が誘導された。

6) 経皮的抗原感作による喘息誘導

昨年報告したように、全身感作の方が経皮感作よりも血清中のOVA特異的IgG1値、BAL液中IL-13濃度はより高値となり、BAL液中の炎症細胞数・好酸球数も全身感作群の方が高い傾向を呈した。しかし、メサコリン気道過敏性については両群とも亢進が見られ、感作経路によって差を認めなかった。さらに、全身感作群における気道炎症、気道過敏性亢進は暴露7日目にはほぼ完全に終熄するのに対して、経皮感作群では暴露7日目でも暴露翌日とほぼ同程度の気道炎症、気道過敏性亢進が持続していた。BAL液中IL-13濃度の上昇も経皮感作でのみ暴露7日目まで持続した。

7) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

これまでに計194名のアトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子解析を行った。フィラグリン遺伝子タイプについては、A/A:18名(9%)、A/B:83名(43%)、A/C:8名(4%)、B/B:63名(32%)、B/C:19名(10%)、C/C:3名(2%)であった。アレルとしてはBタイプが228(59%)と最も多く、次いでAタイプが127(33%)、Cタイプが33(8%)であった。遺伝子変異については、3種類のヨーロッパ型変異はみとめられず、アジア型変異ではS2889X:8名(4.1%)、S3296X:6名(3.1%)、S2554X:2名(1.0%)、3321delA:2名(1.0%)が認められた。フィラグリン遺伝子変異を有する患者は計17名で、患者全体の8.8%であった。

8) 疫学的解析

今年度の当該小・中学生アトピー性皮膚炎の有病率は7.6%、乾燥皮膚のみを呈する小児は1.5%と例年に比べると、減少していた。

皮膚の乾燥を防ぐ適切な入浴法や暖房法、保湿のスキンケアの意義と具体的な方法に関する教育資材による教育介入を一昨年度から本小中学生を対象として行い、昨年度からは同町で出生した乳幼児の保護者全員に対して乳児検診の際に上記の内容の個別対面指導を行うことで、教育効果を高めた。今後、同様の指導を数年間続け、皮膚の乾燥を防ぐ適切な入浴法や暖房法、保湿のスキンケアの意義と具体的な方法を継続的に実践してもらう

D. 考察

フィラグリンノックアウト(KO)マウスの作成は、世界で、7、8カ所の研究施設が作成を試みているが、フィラグリン遺伝子構造が特殊であるため困難を伴っていた。本稿作成時点(平成22年2月)において、他の施設からの報告はなく、世界で初めてフィラグリンノックアウトマウスの作成に成功したことになる。フィラグリンKOマウスは、NMFの著しい低下を認めたものの皮膚バリア機能の指標の一つであるTEWL値に異常を認めなかった。TEWLで見ているのは内から外への水分蒸散量だが、アトピー性皮膚炎で最も問題となる角層のバリア機能は体外から表皮内への物質透過能と考えられる。カルセイン封入りポソームをマウスの皮膚に塗布した結果より、フィラグリンが外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許すことが示唆された。フィラグリンKOマウスはアトピー性疾患発症機序解明において重要なツールとなることが示された。

また、皮膚におけるバリア機能として認識の低かったタイトジャンクションの3次元可視化に成功した。さらに、表皮に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞とタイトジャンクションとの関係を詳細に解析できた。従来まで、皮膚バリアを何らかのかたちでぐり抜けてきた抗原をタイトジャンクションの下で、あるいは表皮の下で真皮で抗原提示細胞が捕捉し、免疫を惹起するものと考えられてきた。ところが、外界からの刺激によりランゲルハンス細胞が活性化されると、タイ

トジャンクションを超えて角層下までその樹状突起を伸ばし、抗原を捕捉することが明らかにされた。しかも、樹状突起と表皮細胞の間にはタイトジャンクションが形成され、バリア機能を保持していた。この発見は、経皮抗原感作機序の概念を一新するとともに、アトピー性疾患発症における皮膚バリア機能障害の重要性を理解する上において確固たる分子基盤を与えたことになる。

教育介入によるアトピーマーチ予防に関する疫学的検討においても、アトピー性皮膚炎の有病率が有意に低下していることが示され、適切なスキンケアを指導しバリア機能を保持することにより、アトピー性疾患発症を予防できる可能性が小規模ながら実際に示されたことになる。スキンケアの重要性を立証するためには、今後も継続的に調査を続ける必要がある。

E. 結論

皮膚バリア機能障害による慢性抗原刺激が、アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的要因であるという新しい仮説のもとに行ってきた3年間の研究成果により、本仮説が正しいものであることが実証されたのみならず、フィラグリノックアウトマウスの作成、flaky tail マウスでのフィラグリノ遺伝子変異の同定、経皮感作による喘息マウスモデルの作出と世界に先駆ける成果をあげることができた。さらに、タイトジャンクションの3次元可視化により、経皮感作におけるランゲルハンス細胞の抗原捕捉機序を初めて解明した。本研究により、抗原曝露における皮膚バリアの役割が初めて分子レベルで明らかにされ、皮膚バリア障害という概念に、より確固とした分子基盤を構築することができた。今後、皮膚バリア機能障害、アトピー性皮膚炎、喘息を結びつける分子レベル、細胞レベルでの詳細な解析により、アトピー性疾患発症機序のさらなる解明が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<英語論文>

1. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A,

Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH: A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. **Nat Genet**, 41 (5): 602-608, 2009.

2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. **J Exp Med**, 206 (13): 2937-2946, 2009.
3. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe JI, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky Tail Mouse Denotes Human Atopic Dermatitis in the Steady State and by Topical Application with Dermatophagoides pteronyssinus Extract. **Am J Pathol**: Epub ahead of print, 2010.
4. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K: Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. **J Clin Invest** (in press)
5. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K: 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. **J Allergy Clin Immunol** (in press)
6. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Similar and distinct properties of MUPPI and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight junction proteins. **Mol. Cell Biol** 29:2372-2389, 2009.
7. Asano K, Nakade S, Shimoi T, Nakajima T, Suzuki Y, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Fujita H, Tanigawara Y, Ishizaka A: Impact of pharmacokinetics on pharmacogenetic association of pranlukast in Japanese asthmatics. **Respirology** 14(6): 822-827, 2009.
8. Asano K, Suzuki H: Silent acid reflux and asthma control (editorial). **New Engl J Med** 360: 1551-1553, 2009.
9. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD: The anti-inflammatory and pro-resolving mediator Resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. **J Immunol** 184:836-43, 2010.
10. Kodama M, Asano K, Oguma T, Kagawa S, Tomomatsu K, Wakaki M, Takihara T, Ueda S, Ohmori N, Ogura H, Miyata J, Tanaka K, Kamiishi N, Fukunaga K, Sayama K, Ikeda

- E, Miyasho T, Ishizaka A: Strain-specific phenotypes of airway inflammation and bronchial hyper-responsiveness induced by epicutaneous allergen sensitisation in BALB/c and C57BL/6 mice. **Int Arch Allergy Immunol Suppl.** (in press)
11. Asano K, Yamada-Yamasawa W, Kudoh H, Matsuzaki T, Nakajima T, Hakuno H, Hiraoka R, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Nagabukuro A, Harada Y, Ishizaka A: ADRB2 variants associated with relative response to β_2 -agonists and anticholinergics in Japanese asthmatics. **Respirology** (in press)
 12. Katoh N. Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. **J Dermatol Sci** 2009; 53: 89-95.
 13. Katoh N. Future perspectives in the treatment of atopic dermatitis. **J Dermatol** 36: 367-376, 2009.
 14. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Platelet-derived microparticles and soluble P-selectin as platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. **Clin Immunol** 131: 495-500, 2009.
 15. Wakamori T, Katoh N, Hirano S, Kishimoto S, Ozasa K. Atopic dermatitis, dry skin and serum IgE in children in a community in Japan. **Int Arch Allergy Immunol** 49: 103-110, 2009.
 16. Nin M, Katoh N, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T, Kishimoto S. Dichotomous effect of ultraviolet B on the expression of corneodesmosomal enzymes in human keratinocytes. **J Dermatol Sci** 54: 17-24, 2009.
 17. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S. Platelets play important roles in the late phase of the immediate hypersensitivity reaction. **J Allergy Clin Immunol** 123: 581-587, 2009.
 18. Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S. The role of IL-33 in chronic allergic conjunctivitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2009; 50: 4646-52.
 19. Nakai A, Katoh N, Germeraad WT, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. **J Dermatol Sci** 53: 40-47, 2009.
 20. Nakai A, Katoh N, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. **J Dermatol Sci** 54: 31-7, 2009.
 21. Kitagawa T, Matsuda, Takenaka H, Katoh N, Inui S, Itami S, Kishimoto S, Kawata M. Keratinocyte growth inhibition through the modification of Wnt signaling by androgen in balding dermal papilla cells. **J Clin Endocrinol Metab** 94: 1288-1294, 2009.
 22. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S. Platelet activation in psoriatic patients: increased plasma levels of platelet-derived microparticles and soluble P-selectin. **J Am Acad Dermatol** (in press)
 23. Nakai N, Kishida T, Hartmann G, Katoh N, Imanishi J, Kishimoto S, Mazda O. IL-12 gene transfer cooperates with Mitf silencing to inhibit melanoma in mice. **Int Immunopharmacol** (in press)
- <日本語論文>
1. 古江増隆, 山崎雙次, 神保孝一, 土田哲也, 天谷雅行, 田中俊宏, 松永佳世子, 武藤正彦, 森田榮伸, 秋山真志, 相馬良直, 照井正, 真鍋求, 日本皮膚科学会学術委員会: 本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査. **日本皮膚科学会雑誌**, 119 (9): 1795 -1809, 2009.
 2. 古瀬幹夫, 岩本典子: 細胞間をシールする分子メカニズム. **最新医学** 64:2450-2455, 2009.
 3. 加藤則人: 好中球性皮膚症. **MB Derma 特集「膿疱ができる疾患」**. 155: 40-45, 2009.
 4. 加藤則人: 「かゆみ Update」. かゆみを止めるにはどうすればいいのか? **Minophagen Medical Review**. 54: 313-318, 2009.
 5. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の治療・最近の進歩. **日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌**. 3: 138-145, 2009.
 6. 益田浩司, 竹中秀也, 加藤則人: 日常診療における皮膚感染症のトピックス. **京府医大誌**. 118: 815 -820, 2009.
 7. 益田浩司, 加藤則人: 汗の異常. **小児科. 特集「子どもの皮膚疾患の診かた」** (印刷中).
 8. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の内服療法. **医薬ジャーナル. 特集「アトピー性皮膚炎の正しい治療」** (印刷中).
2. 学会発表
- <英語発表>
1. Irvine AD, Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Callanan JJ, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean W:

- Filaggrin-deficient mice exhibit enhanced percutaneous antigen priming. **The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Montreal, Canada, 2009. 5. 6 -9.
2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. **11th International Workshop on Langerhans Cells**, Funchal, Madeira, Portugal, 2009. 9. 3- 6.
 3. Fallon PG, Irvine AD, Sasaki T, Sandilands A, Saunders SP, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean I: Filaggrin-deficient mice have an inherent skin barrier defect and recapitulate key features of atopic eczema. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
 4. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: Activated Langerhans cells capture external antigens by sending their dendrites out through epidermal tight junctions. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
 5. Moniaga C, Chikuma M, Kawasaki H, Nakajima S, Tanizaki H, Egawa G, Honda T, Amagai M, Miyachi Y, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
 6. Kawasaki H, Kubo A, Nagao K, Hata T, Amagai M: Filaggrin knockout mice as a tool for understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Osaka, Japan, 2009-12. 2- 4.
 7. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4- 6.
 8. Moniaga C, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4- 6.
 9. K Kabashima: What's new in immunology of metal allergy. **17th International Contact Dermatitis Symposium**, Kyoto, Japan, 2009. 11. 5- 8.
 10. K Kabashima (symposist): Actin cytoskeleton formation through mDial is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Osaka, Japan, 2009-12. 2- 4.
 11. Furuse M: Claudin downregulation by an E3 ligase. **Gordon Research Conference "Cell Contact & Adhesion"**, Waterville Valley, USA, 2009. 6. 28- 7. 3.
 12. Furuse M: Molecular basis for the barrier function of tight junctions. **The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology**. Seoul, Korea, 2009. 8. 20- 21.
 13. Furuse M: Formation of tricellular tight junctions: How the extracellular space is plugged where three epithelial cells meet. **ASCB/JSCB/RIKEN Meeting**. Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling, and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis. Kyoto, Japan, 2009. 9. 21- 23.
 14. Katoh N. What's new in immunology of atopic dermatitis. **17th International Contact Dermatitis Symposium & 10th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium**. Kyoto, Japan, 2009. 11. 6.
 15. Nishimura Y, Ii M, Asai J, Takenaka H, Katoh N, Hamada H, Qin G, Losordo DW, Kishimoto S. CXCR4-selective antagonist AMD3100 accelerates impaired wound healing in diabetic mice. **2009 Society for Investigative Dermatology Annual Meeting (Mini-symposium-Angiogenesis/Vascular Biology/Wound Healing)**. Montreal, Canada, 2009. 5. 6 -9.
- <日本語発表>
1. 天谷雅行: フィラグリン欠損マウスモデル. 第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会, 京都, 2009. 11. 6 - 8.
 2. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 2009. 11. 13- 15.
 3. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第8回ENT病診カンファレンス, 東京, 2009. 11. 18.
 4. 河野通良, 高橋勇人, 山田健人, 天谷雅行: レトロウイルスベクターを用いてデスマグレイン3反応性T細胞受容体遺伝子を導入したCD4陽性T細胞によるinterface dermatitisの誘導. 第16回分子皮膚科学フォーラム, 札幌, 2009. 11. 20 - 21.
 5. 久保亮治, 永尾圭介, 天谷雅行: 活性化した表皮ランゲルハンス細胞の樹状突起は表皮タイトジャンクションバリアを越えて抗原を取り込む. 第39回日本免疫学会総会・学術大会, 大阪, 2009. 12. 2- 4.
 6. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患.

第73回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2010. 2. 20-21.

7. 天谷雅行: 皮膚バリアと経皮免疫. 第6回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎(ワールドコンベンションセンターサミット宮崎), 2010. 2. 26 - 28.
8. 天谷雅行: アトピーと皮膚バリア. 第26回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 東京, 2010. 5. 29 - 30.
9. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第9回皮膚科EBMフォーラム, 札幌, 2010. 6. 26.
10. 古瀬幹夫: Molecular organization of tight junctions in endothelial cells. 第32回日本分子生物学会年会(ワークショップ血管多様性が生み出す生体機能と疾患), 横浜, 2009. 12. 12.
11. 樹神元博, 浅野浩一郎, 小熊剛, 加川志津子, 若木美佐, 友松克充, 小倉裕美, 宮田純, 堀内奈緒, 上田壮一郎, 佐山宏一, 石坂彰敏: 経皮抗原感作喘息モデルマウスの検討. アレルギー好酸球研究会2009, 東京, 2009. 6
12. 樹神元博, 浅野浩一郎, 小熊剛, 加川志津子, 宮田純, 小倉裕美, 友松克充, 堀内奈緒, 上田壮一郎, 滝原崇久, 加行淳子, 新美京子, 若木美佐, 福永興彦, 佐山宏一, 石坂彰敏: 経皮抗原感作喘息モデルマウスの作成, 第49回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009. 6
13. 加藤則人. アトピー性皮膚炎のここが聴きたい. 第25回日本臨床皮膚科医会近畿支部総会・学術大会. 2009. 7. 12. 京都市.
14. 加藤則人. アトピー性皮膚炎患者の治療意欲を高めるコミュニケーションスキル. 第31回西日本小児アレルギー研究会. 2009. 8. 23. 福岡市.
15. 加藤則人. アトピー性皮膚炎: これまでとこれから. 第413回日本皮膚科学会京滋地方会. 2009. 12. 12. 京都市.
16. 加藤則人. 救急医療-即時型アレルギーへの対応「治療と生活指導の実際」. 第108回日本皮膚科学会総会. 2009. 4. 24. 福

岡市.

17. 加藤則人. 皮膚のバリアについてもう一度考える-患者さんにも伝えたい最近の知見-. 第108回日本皮膚科学会総会 イブニングセミナー. 2009. 4. 24. 福岡市.
18. 加藤則人. 乾癬治療における種々の剤形の工夫. 第24回日本乾癬学会 ランチョンセミナー. 2009. 9. 4. 東京都.
19. 加藤則人. アトピー性皮膚炎に対するタクロリムス外用療法. 第59回日本アレルギー学会秋期学術大会. 教育セミナー. 2009. 10. 29. 秋田市.
20. 加藤則人. アトピー外来から発信する免疫・アレルギーの知見. 第39回日本皮膚アレルギー学会・接触皮膚炎学会総会学術大会. シンポジウム「若手が語る基礎免疫・アレルギーの知識」. 2009. 11. 7. 京都市.
21. 加藤則人. 日々の診療を楽しくするコミュニケーションスキル. 第25回日本臨床皮膚科医会・三支部合同学術集会. 2009. 11. 29. 東京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

<特許出願(国際)>

国際出願番号:PCT/JP2009/002161(国際出願日:2009年5月15日)

基礎出願番号:特願2008-303926(出願日:2008/1/28)

国際公開番号:WO2009/139191(国際公開日:2009年11月19日)

特許出願日:2009年5月15日

出願人:学校法人 慶應義塾

発明者:天谷雅行、久保亮治

発明の名称:アレルギー疾患モデル動物

<特許出願(国内)>

出願番号:特願2009-195002(出願日2009年8月26日)

出願人:国立大学法人京都大学

発明の名称:皮膚バリア機能の測定方法

発明者:椋島健治、竹馬真理子、Catharina Moniaga

II. 平成 21 年度分担研究報告

フィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患マウスモデルの作製

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 正常な角層形成に必須の蛋白質であるフィラグリンの遺伝子変異に基づく皮膚バリア機能異常が、アトピー性皮膚炎発症の主要因であるという仮説が注目されている。我々は昨年度、上記仮説を検証するためにフィラグリン欠損マウスを作製した。フィラグリン欠損マウスは、NMFの著しい低下を認めたものの皮膚バリア機能の指標の一つであるTEWL値に異常を認めなかった。一方、マウスの皮膚に色素を塗布し、角層の物質透過性を共焦点顕微鏡により評価したところ、フィラグリンは外から内への角層のバリア機能維持に重要であることが示唆された。フィラグリン欠損マウスは、フィラグリンの機能を正しく評価するための重要なツールとなり、皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とするマウスモデルの作製に有用である。

研究協力者

永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科講師
久保亮治 慶應義塾大学医学部・総合医科学研究センター・特別研究講師
川崎 洋 慶應義学医学部大学院生

プルを得た。角層はトルエンを用いてメンディングテープより抽出した。抽出物をエバポレートして溶媒を除去し、アミノ酸分析装置(日立)によりアミノ酸分析を行った。

A. 研究目的

正常な角層形成に必須の蛋白質であるフィラグリンの遺伝子変異に基づく皮膚バリア機能異常が、アトピー性皮膚炎発症の主要因であるという仮説が注目されている。我々は昨年度、上記仮説を検証するためにフィラグリン欠損マウスを作製した。本研究では、フィラグリン欠損マウスに対する詳細な解析を通してフィラグリンと皮膚バリア機能の関わりを明らかにするとともに、抗原に曝露されてから疾患が発症するまでの発症機序の解析を可能とする初めてのアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指す。

(b) 角層内 Natural moisturizing factor (NMF; 天然保湿因子) 量測定

日齢2~5日のフィラグリン欠損マウス、野生型マウスの腹部皮膚表面より、in vivo 共焦点ラマン分光装置(オランダ、River Diagnostic社、Model3510)を用いて、深さ2 μ m間隔でNMF量を測定した。

(c) フィラグリンと物質皮膚透過性に関する解析

TEWL(trans epidermal water loss: 経皮的水分蒸散量)を測定し、内から外への水分蒸散量に対する検討を行った。

外界から表皮内への物質の皮膚透過性を調べるために、カルセイン封入りポソーム(蛍光物質)をマウスの皮膚に塗布した。フィラグリン欠損マウスと野生型マウス間での皮膚透過性の差を共焦点顕微鏡により組織学的に検討した。

B. 研究方法

1、フィラグリン欠損マウスの機能解析

(a) 角層内アミノ酸分析

日齢4の子マウスを用いて、フィラグリン欠損マウス、野生型マウスの角層アミノ酸分析を行った。マウスの背部皮膚約1.5 \times 2.0cm²の領域に対して、メンディングテープ(Scotch[®])で計6回テープストリッピングを施行し角層サン

2、アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

フィラグリン欠損マウスの耳翼に、人為的皮膚バリア破壊の操作を加えることなく、ダニ抗

原を隔日で繰り返し塗布し、肉眼的皮膚炎の形成を観察した。

C. 研究結果

1. フィラグリン欠損マウスの機能解析

(a) 角層内アミノ酸分析

フィラグリンは角層内アミノ酸の主要構成成分と考えられている。フィラグリン欠損マウスでは、角層内アミノ酸量が減少しているかどうかを観察するために、アミノ酸分析を行ったところ、フィラグリン欠損マウスでは、角層内のアミノ酸量が著しく低下していた(図1)。

(b) 角層内 NMF 量測定

NMF は、フィラグリンが分解して生じるアミノ酸が主な成分である。フィラグリン欠損マウスで NMF が減少しているかどうかを検証するために *in vivo* ラマン分光装置を用い、角層内の NMF 量を測定したところ、フィラグリン欠損マウスでは野生型マウスに比べ、著しい NMF の減少を認めた(図2)。

(c) フィラグリンと物質皮膚透過性に関する解析

皮膚バリア機能の指標として汎用されている TEWL を測定したところ、フィラグリン欠損マウスと野生型マウス間で有意差を認めなかった(図3)。

一方、アトピー性皮膚炎の発症に最も影響する皮膚のバリア機能は、外界の抗原が体内へ侵入するのを防ぐ物質移動の障壁としての作用と考えられる。外界から表皮内への物質の皮膚透過に対しフィラグリン欠損が及ぼす影響について解析した。カルセイン封入りポソームをマウスの皮膚に塗布してから3時間後の皮膚を組織学的に観察したところ、フィラグリン欠損マウスでは角層全層に色素が浸透した像を部分的に観察したのに対し、野生型マウスでは皮膚全周に渡り角層表面にのみ色素の沈着を認めた(図4)。

2. アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

マウス耳翼にダニ抗原を隔日で繰り返し8回塗布したところ、野生型マウスでは耳翼に明らかな変化が見られなかったのに対し、フィラグリン欠損マウスでは肉眼的皮膚炎形成を認めた(図5)。今後は本事象に関し、病理組織学的解析や抗原特異的 IgG、IgE の測定などの血清学的解析を行う予定である。

D. 考察

フィラグリン欠損マウスは、NMF の著しい低下を認めたものの皮膚バリア機能の指標の一つである TEWL 値に異常を認めなかった。TEWL で見ているのは内から外への水分蒸散量だが、アトピー性皮膚炎で最も問題となる角層のバリア機能は体外から表皮内への物質透過能と考えられる。カルセイン封入りポソームをマウスの皮膚に塗布した結果より、フィラグリンが外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許すことが示唆された。

アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製に関する実験では、フィラグリン欠損マウスと野生型マウス間で抗原塗布後の皮膚炎形成に差がある可能性が示唆された。今後は皮膚炎モデル作製に最適な塗布物質、塗布方法、皮膚炎評価法の検討を継続し、人為的皮膚バリア破壊を伴わず自然な発症過程をとり、肉眼的に明らかな皮膚炎を形成する系の確立を目指す。

E. 結論

昨年度我々が作製したフィラグリン欠損マウスは、フィラグリンの機能を正しく評価するための重要なツールとなり、皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とするマウスモデルの作製に有用である。

F. 健康危険情報。

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

<英語論文>

1. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH: A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*, 41 (5): 602-608, 2009.
2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*, 206 (13): 2937-2946, 2009.
3. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe JI, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K:

Flaky Tail Mouse Denotes Human Atopic Dermatitis in the Steady State and by Topical Application with Dermatophagoides pteronyssinus Extract. **Am J Pathol**: Epub ahead of print, 2010.

<日本語論文>

1. 古江増隆, 山崎雙次, 神保孝一, 土田哲也, 天谷雅行, 田中俊宏, 松永佳世子, 武藤正彦, 森田榮伸, 秋山真志, 相馬良直, 照井正, 真鍋求, 日本皮膚科学会学術委員会: 本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査. **日本皮膚科学会雑誌**, 119 (9): 1795-1809, 2009.

2. 学会発表

<英語発表>

1. Irvine AD, Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Callanan JJ, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean W: Filaggrin-deficient mice exhibit enhanced percutaneous antigen priming. **The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Montreal, Canada, 2009. 5. 6-9.
2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. **11th International Workshop on Langerhans Cells**, Funchal, Madeira, Portugal, 2009. 9. 3-6.
3. Fallon PG, Irvine AD, Sasaki T, Sandilands A, Saunders SP, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean I: Filaggrin-deficient mice have an inherent skin barrier defect and recapitulate key features of atopic eczema. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9-12.
4. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: Activated Langerhans cells capture external antigens by sending their dendrites out through epidermal tight junctions. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9-12.
5. Moniaga C, Chikuma M, Kawasaki H, Nakajima S, Tanizaki H, Egawa G, Honda T, Amagai M, Miyachi Y, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9-12.
6. Kawasaki H, Kubo A, Nagao K, Hata T, Amagai M: Filaggrin knockout mice as a tool for understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Osaka, Japan, 2009-12. 2-4.
7. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers **The 34th**

Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4-6.

8. Moniaga C, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4-6.

<日本語発表>

1. 天谷雅行: フィラグリニン欠損マウスモデル. **第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会**, 京都, 2009. 11. 6-8.
2. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. **第37回日本臨床免疫学会**, 東京, 2009. 11. 13-15.
3. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. **第8回ENT病診カンファレンス**, 東京, 2009. 11. 18.
4. 河野通良, 高橋勇人, 山田健人, 天谷雅行: レトロウイルスベクターを用いてデスマグレイン3反応性T細胞受容体遺伝子を導入したCD4陽性T細胞によるinterface dermatitisの誘導. **第16回分子皮膚科学フォーラム**, 札幌, 2009. 11. 20-21.
5. 久保亮治, 永尾圭介, 天谷雅行: 活性化した表皮ランゲルハンス細胞の樹状突起は表皮タイトジャンクションバリアを越えて抗原を取り込む. **第39回日本免疫学会総会・学術大会**, 大阪, 2009. 12. 2-4.
6. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. **第73回日本皮膚科学会東京支部学術大会**, 東京, 2010. 2. 20-21.
7. 天谷雅行: 皮膚バリアと経皮免疫. **第6回宮崎サイエンスキャンプ**, 宮崎(ワールドコンベンションセンターサミット宮崎), 2010. 2. 26-28.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

国際出願番号:PCT/JP2009/002161(国際出願日:2009年5月15日)
基礎出願番号:特願 2008-303926(出願日:2008/11/28)
国際公開番号:WO2009/139191(国際公開日:2009年11月19日)
特許出願日:2009年5月15日
出願人:学校法人 慶應義塾
発明者:天谷雅行、久保亮治
発明の名称:アレルギー疾患モデル動物

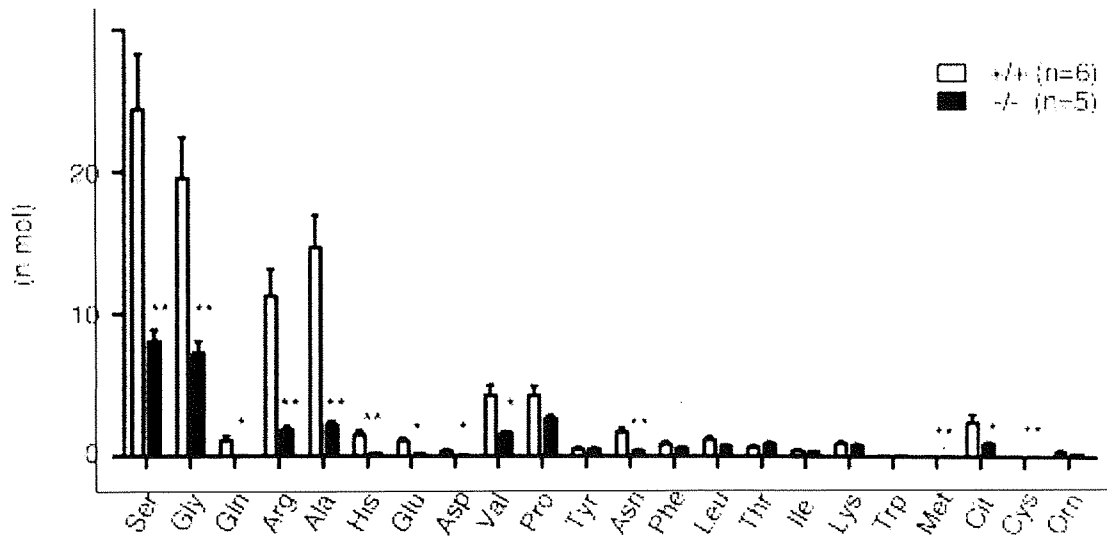
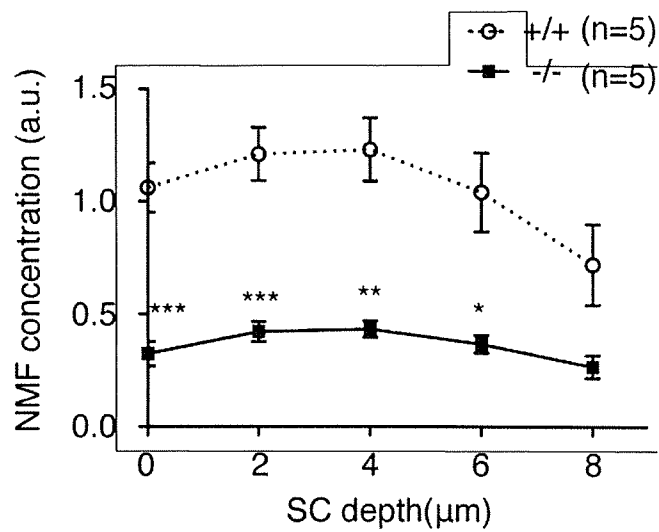


図1 野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との角層内アミノ酸量の比較。



2 野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との角層 NMF 量の比較。

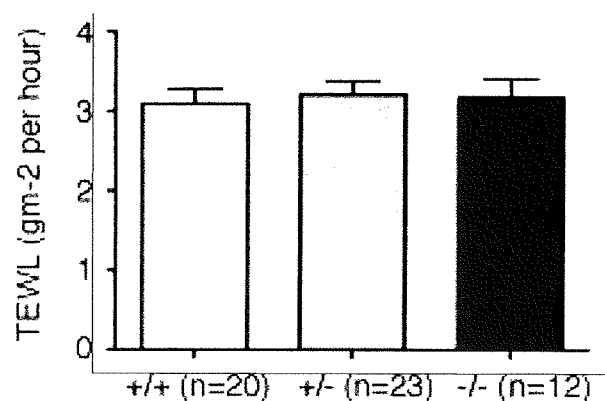


図3 TEWLを測定したところ、野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との間に有意差を認めなかった。(+/-: ヘテロマウス)

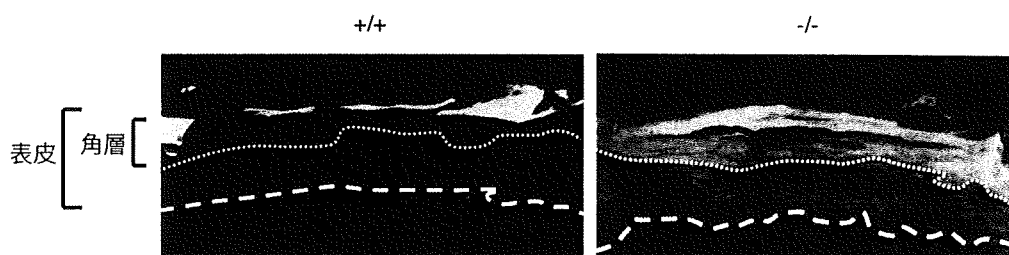


図4 カルセイン封入リポソームをマウスの皮膚に塗布してから3時間後の皮膚を組織学的に観察したところ、フィラグリン欠損マウス(-/-)では角層全層に色素が浸透した像を部分的に観察したのに対し、野生型マウス(+/+)では皮膚全周に渡り角層表面にのみ色素の沈着を認めた。

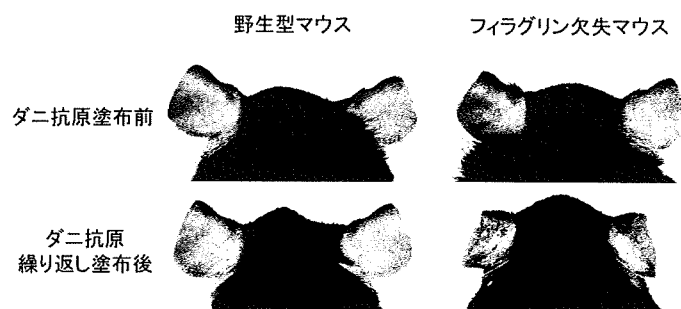


図5 フィラグリン欠損マウス(-/-)にダニ抗原を繰り返し塗布したところ、肉眼的に明らかな皮膚炎形成が観察された。

皮膚タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の協調による
外来抗原捕捉機構に関する研究

研究分担者 久保 亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科学／総合医科学研究センター・特別研究講師

研究要旨 皮膚の表面は、表皮と呼ばれる重層扁平上皮シートにより覆われている。表皮の最外層に角質層が存在し、細胞を乾燥によるダメージから守るとともに、外来抗原が生体内に侵入するのを防いでいる。角質層バリアの内側にタイトジャンクション (TJ) によるバリアが存在している。角質層の内側にある重層扁平上皮細胞層の外側から数えて2層目の細胞の細胞間をTJがシールし、表皮をTJバリアの外側と内側に区画化している。今回我々は、表皮のTJバリアを初めて3次的に観察することに成功した。本法を用いて表皮TJと表皮ランゲルハンス細胞を同時に可視化したところ、休止期のランゲルハンス細胞がTJバリアの内側に留まるのに対し、活性化したランゲルハンス細胞は表皮TJバリアの外側に樹状突起を伸ばすことを発見した。樹状突起の先端部分ではエンドサイトーシスが起こっており、角質層バリアを突破して侵入した抗原をTJバリアの外側で捕捉している可能性が示唆された。また、TJバリアを突き抜けた樹状突起とその両側の表皮細胞との間には、新たなTJが形成されており、表皮TJバリアの恒常性を保っていると考えられた。すなわち、活性化したランゲルハンス細胞は、TJバリアを破綻させることなく、TJバリアの外側に存在する抗原を取得する機能を持つことが示唆された。

研究協力者

天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科教授
永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科講師
川崎 洋 慶應義学医学部大学院生

A. 研究目的

外皮は外界と生体を区切るバリア構造である。体内からの水やイオンの漏出を防ぎ生体内のホメオスターシスを保つとともに、病原微生物やアレルゲンの体内への侵入を防いでいる。脊椎動物の外皮は重層扁平上皮であり、その上層の細胞間をタイトジャンクション (TJ) がシールする。陸生動物では重層扁平上皮の表面を角質層が覆い空気中での乾燥を防いでいる。アトピー性皮膚炎患者において、角質構成蛋白フィラグリンの遺伝子変異が発見されたことから、角質バリア障害による皮膚乾燥とアレルゲンへの易暴露性がアトピー性皮膚炎の発症要因の1つと考えられた。しかし、角質バリアを通過したアレルゲンがどのように免疫系に捕捉されるのかは全く不明であり、本研究にて詳細な解析を行った。

B. 研究方法

マウス耳表皮シートを用いて、表皮TJバリアを立体的に可視化する方法を初めて確立した。本方法を用いて表皮TJバリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化し、その相互作用を検討した。また蛋白ビオチン化試薬およびビオチンラベルした抗原を表皮に塗布し、抗原の取り込み過程を精査した。

C. 研究結果

本方法により、哺乳類表皮TJバリアを世界で初めて *en face* に可視化することに成功した (図1)。表皮は表面から順に角質層・顆粒層・有棘層・基底層の4層からなる。TJバリアは顆粒層の外から2層目の細胞間をシールしていた。次に、TJバリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化した。休止期のランゲルハンス細胞は、基底層と有棘層の間に細胞体があり、樹状突起を表皮上層に向かって伸ばしているが、樹状突起の先端はTJバリアより内側にとどまっていた。角質層をスコッチテープにて3回ストリッ